

УДК 591.69-9

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭНДОБИОНТНЫХ ИНFUЗОРИЙ ИЗ СТАРЫХ КОЛЛЕКЦИЙ В ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

© О. А. Корнилова, Е. Е. Брагина, Л. В. Чистякова

Изучена возможность использования фиксированных формалином эндобионтных инфузорий из старых коллекций в электронно-микроскопических исследованиях (ТЭМ). Для проведения работы использовали *Ditoxum funinucleum* Gassovsky, 1919 из кишечника туркменского кулана *Equus hemionus kulan* Groves et Mazak, 1967, хранившиеся в коллекции на протяжении 19 лет; *Blepharoprosthium pireum* Bundle, 1895 и *Cochliatoxum periachtum* Gassovsky, 1919 из кишечника якутской лошади *Equus caballus* L., хранившиеся 1.5 года; *Triplumaria heterofasciculata* Timoshenko et Imai, 1995 из фекалий азиатского слона *Elephas maximus* L., хранившиеся 2.5 года. Показано, что основные таксономически значимые ультраструктурные признаки кортекса, ресничного аппарата и внутренних фибриллярных структур клетки трихостоматид хорошо сохраняются в формалиновых препаратах на протяжении многих лет.

Основной целью изучения ультраструктуры инфузорий подкласса Trichostomatia Bütschli, 1889 (класс Litostomatea Small et Lynn), к которым относится подавляющее большинство эндобионтных инфузорий млекопитающих, является установление сходства или различия в строении кортекса и ресничного аппарата у разных видов трихостоматид, что позволяет уточнить их место в системе. До 1980-х годов диагностические признаки трихостоматид, как и большинства других таксонов инфузорий, сводились главным образом к наличию и расположению цилиатуры на поверхности тела и в окологротовых зонах, к форме и глубине вестибулума, к размерам и форме самой клетки. Эти признаки хорошо сохранялись в коллекционных материалах на протяжении многих десятилетий (Корнилова, 2004).

В начале 1980-х годов Линн и Смолл (Lynn, 1981; Small, Lynn, 1981) предложили новый для фаунистов подход к строению системы цилиат — на основе ультраструктурных признаков кинетосом и их дериватов (постцилиарных и трансверсальных фибрилл, кинетодесмальных филаментов), характерных для разных таксонов инфузорий. Такая концепция системы цилиат и, в частности, трихостоматид позже получила блестящее подтверждение в работах по молекулярному анализу ДНК инфузорий (Wright, Lynn, 1997).

Проведенная «ультраструктурная диагностика» таксонов оказалась очень удачной для эндобионтных инфузорий, так как способствовала объединению в пределах одного подкласса Trichostomatia практически всех семейств эндобионтных инфузорий млекопитающих, прежде состоявших в несколь-

ких разных высших таксонах цилиат. Для многих трихостоматид было уточнено их место в пределах низших таксонов (Grain, 1994a, б; Lynn, Small, 2000).

Однако из 127 родов трихостоматид на сегодняшний день только по 30 были проведены электронно-микроскопические исследования. Остальные еще предстоит изучить и в этом деле весьма полезными могут быть как новые, так и старые формалиновые коллекции инфузорий, если удастся обнаружить в них сохранившиеся ультраструктурные элементы кортекса и цилиатуры, необходимые для диагностики трихостоматид.

Большинство коллекций эндобионтных инфузорий млекопитающих в мире хранится в 4—10%-ном растворе формалина, в этот фиксатор иногда добавляют CaCO_3 для стабилизации pH. В таких препаратах на протяжении многих десятилетий хорошо сохраняются внешние и внутренние структуры инфузорий, их удобно исследовать с применением различных методик окрашивания, серебрения. Однако возникает вопрос: можно ли к инфузориям из старых коллекций применять современные методики, в частности исследовать ультраструктуру клеток с помощью электронного микроскопа. Это особенно важно для эндобионтных инфузорий из таких редких, исчезающих хозяев, как носороги, тапиры, гориллы и других, так как зачастую в природе уже не удастся найти свежий материал по ряду видов инфузорий, и ученые вынуждены использовать для изучения только старые формалиновые сборы.

Относительно применения формальдегида при фиксации материала для целей электронно-микроскопического исследования высказывались противоречивые мнения. В руководстве Уикли (1975) описаны фиксаторы на основе формальдегида, приготовленные из свежего формалина с высокой степенью чистоты на буферных растворах. Но в коллекционных сборах обычно используют формалин низкого качества и с концентрацией, известной весьма приблизительно. Некоторые специалисты по ТЭМ, с которыми мы обсуждали данный вопрос, категорически отвергали саму возможность использования формалиновых препаратов, тем более длительно хранившихся. Давно занимающиеся инфузориями зоологи, напротив, были уверены в пригодности для ТЭМ формалиновых препаратов с любым сроком хранения. Чтобы окончательно решить эту проблему, было решено провести специальное исследование.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для электронной микроскопии использовали сборы инфузорий (подкласса Trichostomatia), фиксированные 4%-ным формалином: *Ditoxum funinucleum* Gassovsky, 1919 из кишечника туркменского кулана *Equus hemionus kulan* Groves et Mazak, 1967, хранившиеся в коллекции на протяжении 19 лет; *Blepharoprosthium pireum* Bundle, 1895 и *Cochliatoxum periachtum* Gassovsky, 1919 из кишечника якутской лошади *Equus caballus* L., хранившиеся 1.5 года; *Triplumaria heterofasciculata* Tomoshenko et Imai, 1995 из фекалий азиатского слона *Elephas maximus* L., хранившиеся 2.5 года.

Для трансмиссионной электронной микроскопии клетки инфузорий отмывали от формалина в воде и помещали в 2.5%-ный раствор глутаральдегида на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.2 или 7.4). Затем материал postfixировали 1- или 1.25%-ным OsO_4 в 0.1 М какодилатном буфере (1 ч., 0 °C), обезвоживали в спиртах и пропиленоксиде и заключали инфузорий

(поштучно) в смесь аралдита с эпоном. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Reichert IIIС и Reichert-Jung OMU2, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата (1 ч) и цитратом свинца (5 мин) и изучали в электронных микроскопах Hitachi 12, Tesla Bs 500.

Часть материала непосредственно из формалина после отмывки в буфере переносили в раствор OsO_4 без перефиксации в растворе глutarальдегида. При электронно-микроскопическом изучении препаратов, приготовленных двумя разными способами (с использованием глutarальдегида и без него), качественных различий в них не отмечено.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для таксономических исследований инфузорий наиболее важно выявить ультраструктурные особенности кортекса и ресничного аппарата. Общим признаком всех изученных инфузорий класса Litostomatea является особое, не встречающееся в других таксонах устройство трансверсальных фибрилл. Кинетосомы инфузорий класса Litostomatea снабжены всеми традиционными дериватами, однако у литостоматей в данном случае имеется ряд особенностей, главной из которых выступает наличие двух лент трансверсальных фибрилл вместо одной. В каждом комплексе одна трансверсальная фибрилла расположена тангенциально (по касательной) к периметру кинетосомы и простирается вперед в соматический валик левее кинетиды, тогда как другая трансверсальная фибрилла расположена радиально к периметру кинетосомы и простирается поперек в смежный соматический валик. Были выявлены и некоторые отличительные особенности кинетосомного комплекса у инфузорий подкласса Trichostomatia.

У представителей подкласса Trichostomatia наблюдаются различные приспособления, придающие кортексу высокую механическую прочность. При этом обнаруживаются как структуры, сходные у представителей разных таксонов (вплоть до уровня подкласса), так и уникальные, специфические для семейств, родов. Так, у многих энтодиниоморфид в составе кутикулы имеются многочисленные длинные пластины (мы назвали их «темные пластины» — ТП), лежащие плоскостями параллельно друг другу и тянущиеся вдоль всей клетки от переднего к заднему концу. Они хорошо видны на поперечных разрезах инфузорий разных видов (рис. 1, 2). Особенно большой мощности достигают эти структуры у *Cochliatoxum periachtum* (рис. 1), здесь ТП достигают ширины 800 нм, толщины 80—100 нм и отстоят друг от друга на 70—90 нм. Сходно устроена кутикула *Ditoxum funinucleum* (рис. 2) и других дитоксид. Как видим, эти элементы кортекса отлично сохранились в формалиновых препаратах длительного хранения. Специфическое устройство ТП у *Cochliatoxum* даже может дать основание для перемещения данного монотипичного рода из сем. Spirodiniidae в сем. Ditoxidae.

Непосредственно под кутикулой у энтодиниоморфид расположены скелетные пластины (СП), как например, у *Triplumaria longinucleata* (рис. 3), их форма и толщина являются ценными диагностическими признаками.

У всех изученных нами инфузорий хорошо выявлялись кинетосомные комплексы, в том числе раздвоенные пучки трансверсальных фибрилл ТФ (рис. 4), однако с точки зрения нахождения таксономических различий внутри подкласса Trichostomatia рассмотрение традиционных дериватов соматических кинетосом не дает большого веса, так как они устроены сходно у представителей всего класса Litostomatea и выступают как диагностические



Рис. 1. Поперечный срез *Cochliatoxum periactum* в средней части клетки.
 БК — безресничные кинетосомы, МА — макронуклеус, ТП — «темные пластины». Масштабная линейка (здесь и на рис. 2–10) — 1 мкм.

Fig. 1. Transmission electron micrographs of *Cochliatoxum periactum*, transverse section through the middle part of the cell.

признаки на уровне классов инфузорий. Несомненно, более весомым для диагностики выступает наличие таких признаков, как специфические для трихостоматид ретроцилиарные фибриллы (РФ) или немадесмы, хорошо различимые как на продольных (рис. 3, 5), так и на поперечных срезах (рис. 6); сформированные из трансверсальных фибрилл (ТФ) кинетосом адоральной зоны характерные «занавесы», обрамляющие глотку (ЗЦ, рис. 7).



Рис. 2. Поперечный срез *Ditoxum funinucleum* в средней части клетки.
 ПФС — «пограничная фибриллярная система», ТП — «темные пластины».

Fig. 2. Transmission electron micrographs of *Ditoxum funinucleum*, transverse section through the middle part of the cell.

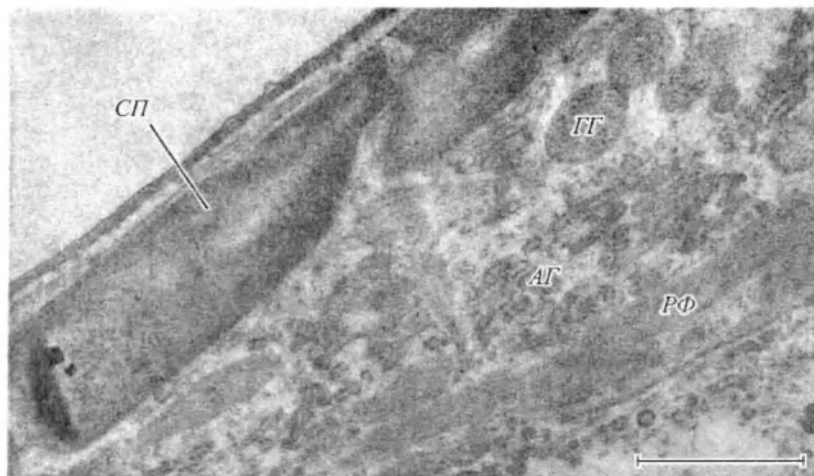


Рис. 3. Поперечный срез *Triplumaria heterofasciculata* в средней части клетки.
 АГ — аппарат Гольджи, ГГ — гидрогеносомы, РФ — ретроцилиарные фибриллы, СП — скелетные пластины.
 Fig. 3. Transmission electron micrographs of *Triplumaria heterofasciculata*, transverse section through the middle part of the cell.

Особый интерес для систематики представляют «булавовидные реснички» (БР), перемежающиеся гребнями пелликулы (ГП) в составе вакуоли с конкрециями у бучлид, например, у *Blepharoprosthium pireum* (рис. 8). Проксимальный диаметр такой реснички около 200 нм, дистальный — более 300 нм. В свое время основным аргументом для перемещения Buetschliidae из отряда Prostomatida Schewiakoff, 1896 (п/кл Gymnostomatia Bütschli, 1889 по системе Levine et al., 1980) в специально созданный подотряд Arc-



Рис. 4. Поперечный срез *Cochliatoxum periachtum* в области соматической ресничной дуги.
 БК — безресничные кинетосомы, ТФ — трансверсальные фибриллы.
 Fig. 4. Transmission electron micrographs of *Cochliatoxum periachtum*, transverse section through somatic kinetosomes.

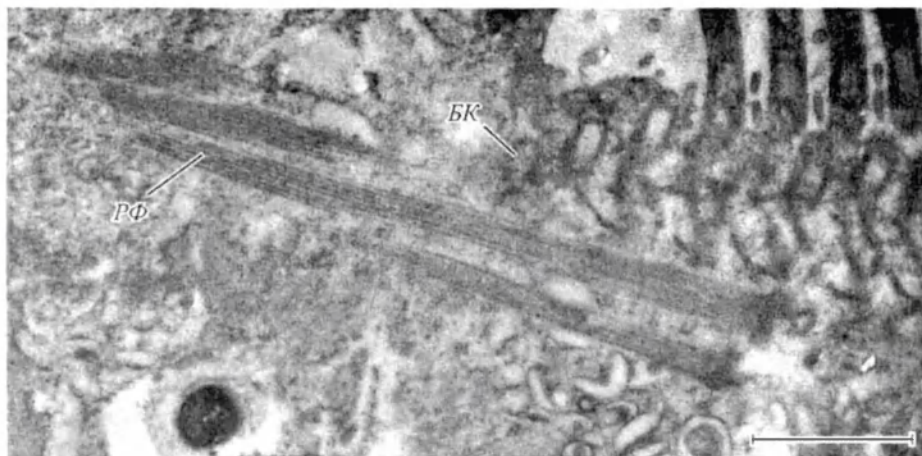


Рис. 5. Продольный срез *Ditoxum funinucleum* в области соматической ресничной дуги.

Обозначения те же, что и на рис. 1, 3.

Fig. 5. Transmission electron micrographs of *Ditoxum funinucleum*, longitudinal section through somatic kineties.

histomatina Puytorac et al., 1974 (отряд Haptorida Corliss, 1974, подкласс Litostomatea sensu Grain, 1994) явилось именно устройство булавовидных ресничек у представителей бючлид, сходных с ресничками «паралабиального органа» энтодиниоморфид. Весомое место в диагностике трихостоматид занимает и определенная локализация безресничных кинетосом (БК, рис. 1, 4, 5).

Важным для таксономии является такой признак, как устройство фибриллярно-филаментозных структур «пограничного фибриллярного слоя» (ПФС), лежащих на границе эктоплазмы и эндоплазмы (рис. 2, 9). На по-

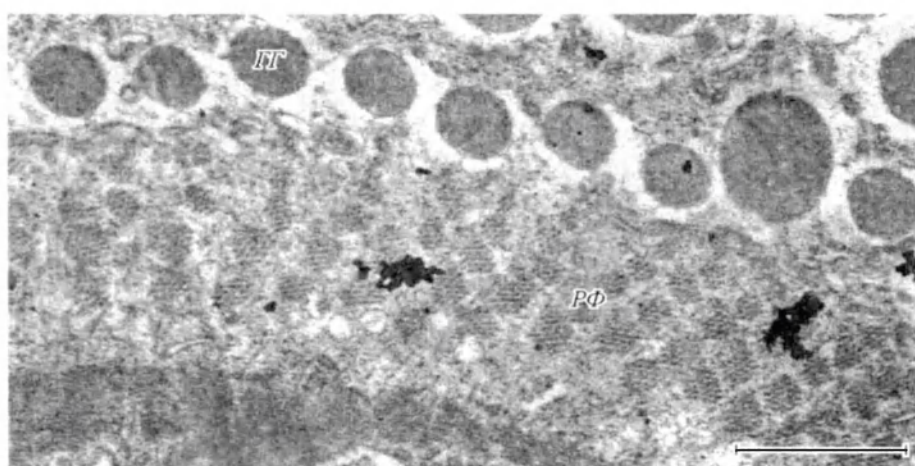


Рис. 6. Поперечный срез *Blepharoprosthium pireum* на уровне середины вестибулума.

Обозначения те же, что и на рис. 3.

Fig. 6. Transmission electron micrographs of *Blepharoprosthium pireum*, transverse section through the middle of vestibulum wall.

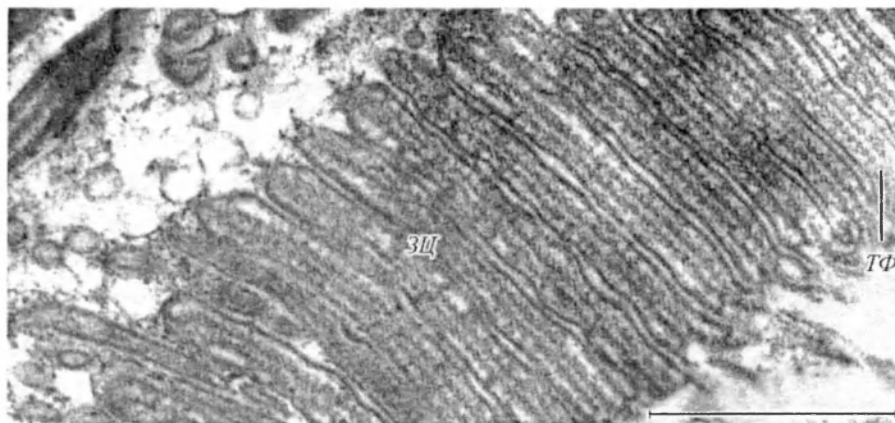


Рис. 7. Поперечный срез *Cochliatoxum periachtum* на уровне середины вестибулума.

ЗЦ — «занавесы», ТФ — трансверсальные фибриллы.

Fig. 7. Transmission electron micrographs of *Cochliatoxum periachtum*, transverse section through the middle of vestibulum wall.

перечном срезе дитоксума (рис. 2) хорошо виден особый рисунок такой структуры, свойственный многим трихостоматидам — в виде «елочки».

К числу характерных ультраструктурных признаков различных трихостоматид можно отнести компактные скопления некоторых органелл и включений в определенных местах в клетке, как например, диктиосом аппарата Гольджи (АГ, рис. 3), гранул амилопектина (ГА, рис. 8), гидрогеносом (ГГ, рис. 3, 6, 10), кальцинированных «конкреций» (К), вакуоли с конкрециями (ВК), обрамленной ретроцилиарными фибриллами (РФ) (рис. 9) и ряда других. Легко опознается макронуклеус (МА) с темными глыбками хроматина (рис. 1). У энтодиниоморфид наблюдается особенно мощное скопле-

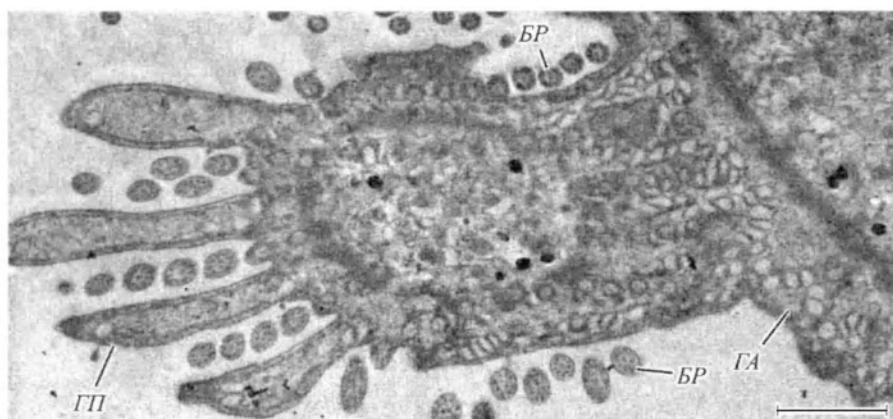


Рис. 8. Поперечный срез *Blepharoprosthium pireum* на уровне верхнего края вакуоли с конкрециями.

БР — безресничные кинетосомы, ГА — гранулы амилопектина, ГП — гребни пелликулы.

Fig. 8. Transmission electron micrographs of *Blepharoprosthium pireum*, transverse section through the apical part of the concretum vacuole.

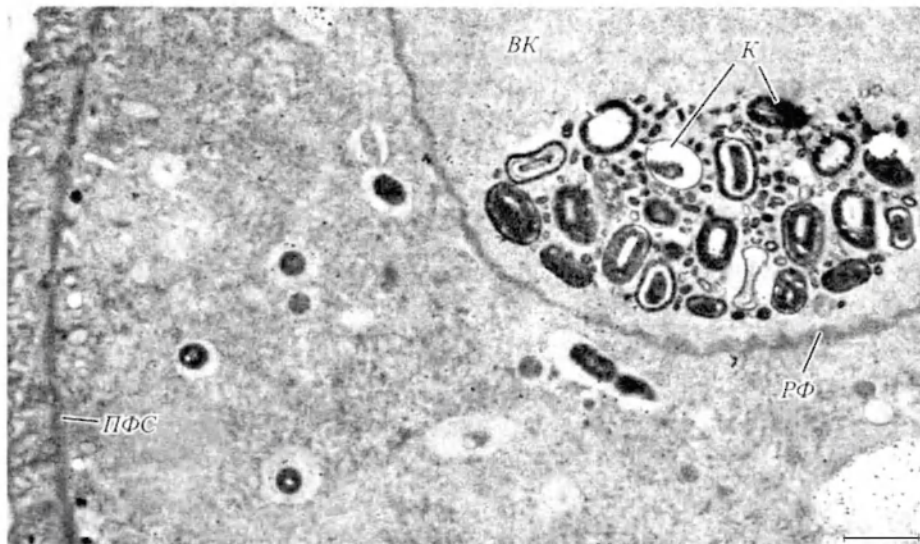


Рис. 9. Поперечный срез *Blepharoprosthium pireum* на уровне нижнего края вакуоли с конкрециями.

БК — вакуоль с конкрециями, К — «конкреции», ПФС — «пограничная фибриллярная система», РФ — ретроцилиарные фибриллы.

Fig. 9. Transmission electron micrographs of *Blepharoprosthium pireum*, transverse section through the bottom of the concretment vacuole.

ние гидрогеносом (ГГ) в районе ресничных полей (РП), например у триплумарии (рис. 10).

Проведенные нами исследования показали, что все основные таксономически значимые ультраструктурные признаки трихостоматид отлично сохранились в формалиновых препаратах со сроком хранения до двух де-

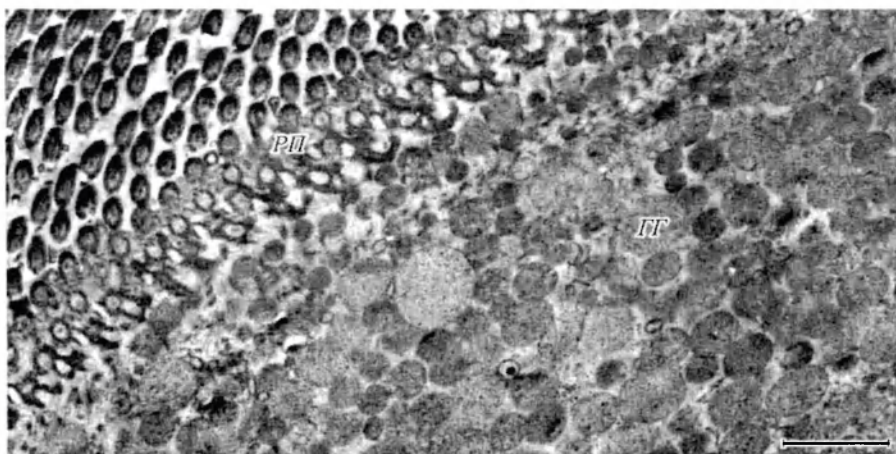


Рис. 10. Продольный срез *Triplumaria heterofasciculata* в области соматического ресничного пучка.

ГГ — гидрогеносомы, РП — «ресничное поле».

Fig. 10. Transmission electron micrographs of *Triplumaria heterofasciculata*, longitudinal section through somatic kineties.

сятков лет. Таким образом, мы можем с уверенностью рекомендовать для электронно-микроскопического изучения кортекса, ресничного аппарата, внутренних фибриллярных и мембранных структур клетки использование фиксированных в формалине и хранившихся в коллекциях на протяжении десятилетий эндобионтных инфузорий млекопитающих.

Список литературы

- Корнилова О. А. История изучения эндобионтных инфузорий млекопитающих. СПб.: Изд-во «ТЕССА», 2004. 352 с.
- Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с.
- Grain J. Classe des Litostomatea Small et Lynn, 1981 // *Traite de Zoologie: Infusoires Cilies* / Ed. by P. Grasse, P. de Puytorac. Paris: Masson, 1994a. Vol. 2 (2). P. 267—310.
- Grain J. Class Vestibuliferea de Puytorac et al., 1974 // *Traite de Zoologie: Infusoires Gilies*. Ed. by P. Grasse, P. de Puytorac. Paris: Masson, 1994b. Vol. 2 (2). P. 311—379.
- Lynn D. H. The organization and evolution of microtubular organelles in ciliated protozoa // *Biol. Rev.* 1981. Vol. 56. P. 243—292.
- Lynn D. H., Small E. B. Phylum Ciliophora, Doflein, 1901 / Ed. by J. J. Lee, G. F. Leedale, P. Bradbury. *An Illustrated Guide to the Protozoa* (2nd edit.). Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas. 2000. Vol. 1. P. 371—656.
- Small E. B., Lynn D. H. A new macrosystem for the Phylum Ciliophora Doflein, 1901 // *Bio-Systems*. 1981. Vol. 14. P. 387—401.
- Wright A-D. G., Lynn D. H. Monophyly of the trichostome ciliates (phylum Ciliophora: class Litostomatea) tested using new 18 S rRNA sequences from the vestibuliferids, *Iso-tricha intestinalis* and *Dasytricha ruminantium*, and the haptorian, *Didinium nasutum* // *Eur. Journ. Protistol.* 1997. Vol. 33. P. 305—315.

Российский государственный педагогический университет
им. А. И. Герцена,
Санкт-Петербург,
НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского,
Москва,
Биологический НИИ СПбГУ,
Санкт-Петербург

Поступила 19 XII 2005

THE USE OF ENDOBIOTIC CILIATES FROM OLD COLLECTIONS IN TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPIC INVESTIGATIONS

O. A. Kornilova, E. E. Bragina, L. V. Chistiakova

Key words: ciliates, Trichostomatia, Entodiniomorphida, Buetschliidae, transmission electron microscopy, TEM.

SUMMARY

The opportunity of the use of formalin-fixed endobiotic ciliates from old collections in transmission electron microscopic investigations (TEM) has been studied. Ciliates from the following species were examined: *Ditoxum funinucleum* Gassovsky, 1919 from the hindgut of *Equus hemionus kulan* Groves et Mazak, 1967 preserved in a collection during 19 years, *Blepharoprosthium pireum* Bundle, 1895 and *Cochliatoxum periachtum* Gassovsky, 1919 from the hindgut of the Yakut horse *Equus caballus* L. stored during 1.5 years, and *Triplumaria heterofasciculata* Timoshenko et Imai, 1995 from faeces of the Asian elephant *Elephas maximus* L. stored during 2.5 years. It is shown, that the main taxonomically important characters of the cortex ultrastructure, ciliature, and internal fibril structure of the cell of Trichostomatia keep well during a long-term storage in formalin.